

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 janvier 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/00836 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N (74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/02100 (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 29 juin 2001 (29.06.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/08436 29 juin 2000 (29.06.2000) FR (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). ENTOMED [FR/FR]; Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brant, F-64700 Illkirch (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (73) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). LAMBERTY, Mireille [FR/LU]; 11, rue des Jardins, L-6738 Grevenmacher (LU).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL PEPTIDES, PREPARATION METHOD AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM

(54) Titre : PEPTIDES ANTIBACTERIENS ET ANTIFONGIQUES, LEUR PROCÉDE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns peptides of formula: $\beta_1 \phi_2 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21} \phi_{22}$ $\sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$ wherein: β is a basic amino acid, ϕ is a hydrophobic amino acid, θ is a negatively charged or polar/large type amino acid, σ is an amino acid selected among glycine, serine, alanine or threonine. The invention also concerns antibacterial and antifungal compositions for use in man, animal or plants comprising at least said peptides.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des peptides de formule: $\beta_1 \phi_2 \theta_3 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21} \phi_{22} \sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$ dans laquelle: β est un acide aminé basique, ϕ est un acide aminé hydrophobe, θ est un acide aminé chargé négativement ou de nature polaire/large, σ est un acide aminé choisi parmi la glycine, la sérine, l'alanine ou la thréonine. L'invention concerne aussi des compositions antibactériennes ou antifongiques pour être utilisées chez l'homme, l'animal ou les plantes comprenant au moins desdits peptides.

Applicants: Peter David East and Susan Elizabeth Brown
U.S. Serial No.: 10/590,539
Filed: as §371 national stage of PCT/AU2005/000234
Exhibit 21

WO 02/00836 A2

PEPTIDES ANTIBACTERIENS ET ANTIFONGIQUES, LEUR
PROCÉDE DE PRÉPARATION ET LES COMPOSITIONS LES CONTENANT.

La présente invention a pour objet de nouveaux peptides ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques. L'invention concerne également la préparation de ces peptides et les compositions les contenant utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale.

La production de peptides antimicrobiens représente, chez une grande variété d'espèces animales et végétales, un mécanisme essentiel de défense immunitaire contre les infections. En particulier, les insectes présentent une résistance très efficace contre les bactéries et les champignons. Cette réponse repose pour une large part sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides antimicrobiens à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries. A ce jour, les peptides antimicrobiens d'insectes ont été surtout caractérisés à partir d'insectes ayant une métamorphose complète pendant le développement, par exemple les diptères, lépidoptères et coléoptères. Parmi les peptides antibactériens induits chez ces insectes, on peut distinguer les quatre groupes suivants :

- Des peptides cationiques de 4 kDa, formant deux hélices α amphipathiques. Dans ce groupe, on classe en particulier les cécropines.

- Des peptides cationiques riches en proline, de taille comprise entre 2 kDa et 4 kDa qui peuvent-être glycosylés, comme par exemple, la drosocine, la pyrrhocoricine, et les lébocines, ou non glycosylés comme par exemple, les apidaécines et les métalnikowines.

- Plusieurs polypeptides distincts, ayant un poids moléculaires de 8 à 27 kDa, pour la plupart cationiques et fréquemment riches en résidus glycine comme par exemple les attacines, les sarcotoxines II, les diptéricines et la coléoptéricine.

- Des peptides comprenant des ponts disulfures intramoléculaires. Dans ce groupe, on classe les défensines d'insecte (4 kDa, 3 ponts disulfure), la drosomycine (4 kDa, 4 ponts disulfure) et la thanatine (2 kDa, 1 pont disulfure).

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

A	Ala	alanine
C	Cys	cystéine
D	Asp	acide aspartique
E	Glu	acide glutamique
F	Phe	phénylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	méthionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	sérine
T	Thr	thréonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophane
Y	Tyr	tyrosine

Peu de travaux ont été entrepris à ce jour sur les insectes à métamorphose incomplète, en particulier les polynéoptères. Or il a précisément maintenant été isolé, à partir d'un insecte à métamorphose incomplète, le termite *Pseudacanthotermes spiniger*, un peptide, qui présente des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés antibactériennes et antifongiques.

Ce peptide qui sera aussi désigné ci-après « spinigérine » répond à la formule ci-dessous aussi donnée en annexe sous le numéro ID NO :1.

H V D K K V A D K V L L L K Q L R I M R L L T R L

Cette molécule, de taille réduite, ne comporte pas de résidus cystéine. La Demanderesse a étudié la conformation spatiale de la molécule et les mutations susceptibles d'être réalisées sur sa séquence de façon à augmenter ses propriétés bactéricides et/ou fongicides. La présente invention a donc pour objet un peptide de séquence (I) suivante :

$\beta_1 \phi_2 \theta_3 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21} \phi_{22} \sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$

ou un fragment de celle-ci, dans laquelle :

- β est un acide aminé basique,

- ϕ est un acide aminé hydrophobe,

- θ est un acide aminé chargé négativement ou de nature polaire/large,

- σ est un acide aminé choisi parmi la glycine, la sérine, l'alanine ou la thréonine,

Les peptides de formules (I) présentent avantageusement une conformation en hélice alpha. Ainsi, β, ϕ, θ et σ sont choisis de façon à ce que lesdits peptides de formule (I) présentent une telle conformation.

On entend par fragments de la séquence ci-dessus, un peptide constitués d'au moins 10 et de préférence d'au moins 20 acides aminés successifs de ladite séquence.

A titre d'exemple de tels fragments, l'invention envisage plus particulièrement, un peptide de formule (I) ci-dessus dont un groupe de 1 à 4 acides aminés à l'une et/ou l'autre des extrémités N et/ou C terminales est supprimé.

De tels peptides sont ceux dont un ou plusieurs des acides aminés β_1 , ϕ_2 , θ_3 , ϕ_{22} , σ_{23} , β_{24} , ou ϕ_{25} sont absents. L'invention envisage plus particulièrement, un peptide de formule ci-dessus dont les acides aminés β_1 , ϕ_2 , θ_3 et/ou ϕ_{22} , σ_{23} , β_{24} , ϕ_{25} sont absents répondant et donc répondant aux formules suivantes :

$\beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21} \phi_{22} \sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$
(II)

$\beta_1 \phi_2 \theta_3 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21}$ (III)

$\beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21}$ (IV)

On entend plus particulièrement par :

- acide aminé basique, ceux choisis parmi l'arginine, la lysine ou l'histidine,

- acide aminé hydrophobe, ceux choisis parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, ou le tryptophane,

- acide aminé chargé négativement ou de nature polaire/large, ceux choisis parmi l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine, ou la glutamine.

Un exemple préféré de peptide selon l'invention est de séquence ID NO : 1 suivante :

H V D K K V A D K V L L L K Q L R I M R L L T R L

ou un fragment de celle-ci comme défini précédemment, et plus particulièrement les séquences SEQ ID NO : 2, 3, 4 ci-dessous :

K K V A D K V L L L K Q L R I M R L L T R L (SEQ ID NO : 2)

H V D K K V A D K V L L L K Q L R I M R L (SEQ ID NO : 3)

K K V A D K V L L L K Q L R I M R L (SEQ ID NO : 4)

5 Les peptides de l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique ou par génie génétique.

10 L'invention concerne aussi des équivalents fonctionnels des peptides ci-dessus, dont les séquences d'acides aminés comprennent des délétions, des additions et/ou des modifications conservatives au niveau d'un ou plusieurs acides aminés, dès lors que ces délétions, additions et/ou modification ne modifient pas l'activité antimicrobienne du peptide dont elles sont issues, et par exemple pas la structure en hélice alpha.

15 On peut citer notamment les modifications résultant des processus postraductionnels comme des glycosylation ou de la dégénérescence du code génétique, ou encore des modifications chimiques telles que l'amidation, l'acétylation, l'acylation, le couplage avec
20 des lipides ou des sucres, le couplage avec des nucléotides, etc....

25 Les équivalents fonctionnels comprennent également des peptides de l'invention dont un ou plusieurs des acides aminés des acides aminés sont des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés naturels de conformation D, des acides aminés rares notamment l'hydroxyproline, la méthyllysine, la diméthyllysine et les acides aminés synthétiques, notamment l'ornithine, la norleucine, la cyclohexylalanine et les oméga-aminoacides.
30 L'invention couvre également les rétropeptides et les rétro-inverso-peptides.

35 L'invention a aussi pour objet l'utilisation des peptides ci-dessus ou d'analogues de ceux-ci, pour prévenir ou traiter une infection fongique ou bactérienne tant chez l'homme et l'animal que chez les plantes.

L'invention a donc pour objet une composition, plus particulièrement antibactérienne ou antifongique, comprenant à titre d'agent actif au moins un peptide tel que défini précédemment, avantageusement associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

Le véhicule est choisi en fonction du type d'application de la composition à titre pharmaceutique ou agronomique.

L'invention concerne tout particulièrement les applications pharmaceutiques chez l'homme et l'animal de ces peptides et des compositions les contenant, mais elle s'intéresse aussi aux applications agronomiques. En effet, les peptides de l'invention sont utiles pour rendre des plantes résistantes contre des maladies notamment fongiques et bactériennes. Une première forme de mise en œuvre de cette application agronomique, consiste à appliquer sur les plantes une quantité efficace de peptide ou d'une composition les contenant. Une seconde forme de mise en œuvre de cette application agronomique consiste à transformer des cellules végétales ou des plantes avec une séquence d'acide nucléique capable d'exprimer le peptide de l'invention de façon à conférer aux plantes une résistance aux maladies.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant la purification et l'identification de la spinigérine, la synthèse de la spinigérine synthétique et son activité antibactérienne et antifongique.

Exemple 1 : Matériels et Méthodes utilisés pour la purification et l'identification de la spinigérine.

1) Insectes.

Toutes les expériences ont été réalisées avec des adultes essaimants désaillés de l'espèce

Pseudacanthotermes spiniger (Ordre des isoptères, famille des Termitidae, sous-famille des Macrotermitinae). Ces insectes proviennent d'un élevage réalisé à l'Unité Mixte de Recherche du CNRS « développement, Communication chimique », Dijon.

2) Extraction des peptides.

L'extraction des composés antimicrobiens a été réalisée à partir des insectes entiers qui ont été congelés dans l'azote liquide. Les termites (200) ont été réduits en fine poudre dans un mortier contenant de l'azote liquide. Les peptides ont été extraits à pH3 par 100 ml d'acide trifluoroacétique (TFA, 0,1%) contenant de l'aprotinine (10 µg/ml concentration finale) comme inhibiteur de protéase et de la phénylthiourée (20 µM concentration finale) comme inhibiteur de mélanisation. L'extraction a été réalisée dans un bain-marie à eau glacée avec agitation douce durant 30 minutes. Après centrifugation (14 000 x g durant 30 min à 6°C), le surnageant clarifié a été directement déposé sur une cartouche Sep-Pak C₁₈ Vac (5g de phase, Waters™). La cartouche a été conditionnée au méthanol et équilibrée avec de l'eau acidifiée (0,05% TFA), les éluions ont été réalisées avec des solutions de 5%, 40% et 80% d'acétonitrile dans de l'eau contenant 0,05% TFA. La fraction éluee par la solution d'acétonitrile à 40% a été lyophilisée avant passage sur HPLC en phase inverse.

3) Purification des peptides par HPLC.

- Etape 1 : La fraction Sep-Pak 40% a été soumise à une chromatographie en phase inverse sur colonne semi-préparative Aquapore RP-300 C₁₈ (250 x 7 mm, Brownlee™). Equilibrée avec une solution d'acétonitrile à 2% dans de l'eau acidifiée. Les fractions ont été séparées à l'aide d'un gradient linéaire de 2% à 60% d'acétonitrile

dans de l'eau acidifiée en 120 min avec un débit de 1,3 ml/min. A l'issue de cette étape, on obtient plusieurs fractions représentées sur la figure 1 présentant une activité antimicrobienne sur les germes suivants : *E. coli* 363, *Neurospora crassa*, *Micrococcus luteus*. Les composés actifs des fractions F1 et F2 ont ensuite été caractérisés.

- Etape 2 : La deuxième étape de purification a été réalisée sur colonne analytique Aquapore OD-300 (220 x 4,6 mm, Brownlee™). L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient biphasique d'acétonitrile dans l'eau acidifiée, de 2 à 18% durant 10 min et de 22 à 42 % durant 100 min avec un débit de 0,8 ml/min.

- Etape 3 : La fraction contenant la molécule antimicrobienne a été purifiée à homogénéité en utilisant une colonne narrow bore C₁₈ en phase inverse (Delta Pak HPIC₁₈, 2x 150 mm, Waters™). La colonne a été équilibrée dans de l'eau acidifiée et développée avec le même gradient linéaire d'acétonitrile que celui décrit ci-dessus dans l'étape 2.

Toutes les étapes de purification à température ambiante ont été réalisées sur un système Beckman Gold HPLC équipé d'un détecteur Beckman 168 photoarray. Pour les étapes de purification sous température contrôlée, un système HPLC all PEEK Waters (modèle de pompe Waters 626) attaché à un détecteur à absorbance variable (Waters 486) a été utilisé. Au cours des étapes de purification HPLC les molécules éluées de la colonne ont été détectées par leur absorbance à 225 nm. Les fractions ont été collectées manuellement, séchées sous vide (Speed-Vac, Savant) et reconstituées dans de l'eau MilliQ (Millipore™) avant analyse de l'activité antimicrobienne.

4) Analyse par spectrométrie de masse.

Elle est réalisée selon la technique dite de mesure du temps de vol après désorption laser assistée par matrice (Technique MALDI TOF) en utilisant un spectromètre de masse Bruker (Bremen) BIFLEX.

5

5) Analyse des séquences.

Les séquences des peptides sont analysées selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman à l'aide d'un séquenceur Applied Biosystems 473A.

10

6) Identification des peptides de la fraction F1.

Malgré la présence de deux composés peptidiques, la fraction purifiée active contre les souches microbiennes *Eschericia coli*, *Micrococcus luteus* et *Neurospora crassa*, a été soumise au séquençage. L'analyse des signaux PTH-acides aminés a mis en évidence deux séquences, l'une correspondant à une forme tronquée de l'autre dans sa partie N-terminale. Les masses moléculaires calculées à partir des séquences obtenues sont respectivement de 2649,4 et 3000,8 Da. Elles sont en accord avec les masses moléculaires mesurées par spectrométrie de masse MALDI-TOF de 2649,5 Da et 3000,7 Da confirmant que les séquences sont complètes. La molécule de masse moléculaire 2649,5 Da correspond à celle de 3000,7 Da dépourvue des trois résidus de l'extrémité amino-terminale du peptide. Le séquençage d'une fraction voisine (Fraction F2) contenant une molécule de masse moléculaire 2516,2 Da a permis de déterminer une troisième forme du peptide correspondant à la molécule de masse moléculaire 3000,7 Da dépourvue des quatre acides aminés carboxy-terminaux. L'ensemble de ces résultats est rapporté dans le tableau 1 ci-dessous.

35

Tableau 1

Numéro de la fraction	Masse moléculaire (Da) Calculée/Mesurée	Séquence en acides aminés
F1	3000,8 / 3000,7 2649,4 / 2649,5	HVDKKVADKVLLKQLRIMRLTRL ---KKVADKVLLKQLRIMRLTRL
F2	2517,2 / 2516,7	HVDKKVADKVLLKQLRIMRL----

5 Exemple 2 : synthèse de la spinigérine synthétique.

Les peptides selon l'invention peuvent également être obtenus selon un procédé synthèse chimique FMOC (Atherton and Sheppard R.C. (1989), Solid Phase Peptide Synthesis (IRL, Oxford, UK) . La synthèse chimique
10 a été réalisées pour la spinigérine (HVDKKVADKVLLKQLRIMRLTRL) . Le peptide obtenu présente les mêmes propriétés chromatographiques que la molécule native. La masse mesurée est identique à celle de la
15 molécule native. La molécule synthétique présente la même activité antibactérienne que la molécule native sur la bactérie *Micrococcus luteus*.

L'ensemble des tests antibactériens est réalisé avec la molécule synthétique. Cette molécule a des
20 propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, des bactéries phytopathogènes et des champignons phytopathogènes.

25 Exemple 3 : détection des activités antimicrobiennes.

La méthode a été utilisée pour la mise en évidence des molécules antimicrobiennes au cours des différentes étapes de purification, pour la
30 détermination du spectre d'activité du peptide et pour la détermination de la concentration minimale

inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide a été actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de la spinigérine vis-à-vis des champignons filamenteux et des levures, sont donnés dans les tableaux 2 et 3 ci-après.

1) Détection de l'activité antibactérienne.

Pour chaque souche de bactérie utilisée (Bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif), une colonie isolée est mise en suspension dans 10 ml de milieu PB (Poor Broth, milieu Luria Bertani dépourvu d'extrait de levure) DIFCO et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation lente. Les suspensions de bactéries à tester sont ajustées à une densité optique à 600 nm de 0,001 dans un milieu de culture frais. On dépose 10 µl de chaque fraction dans des plaques de microtitration en présence de 100 µl de la suspension bactérienne. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C, on évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

Les bactéries sont les suivantes :

- Gram positif : *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

- Gram négatif : *Escherichia coli* D22, *Escherichia coli* SBS 363, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*.

La tableau 2 ci-dessous rapporte l'activité de la spinigérine contre les bactéries.

Tableau 2

Bactéries	Spinigérine CMI (μM)
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus megaterium</i>	0,8-1,5
<i>Micrococcus luteus</i>	0,8-1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND*
Bactéries à Gram négatif	
<i>Escherichia coli</i> D22	3-6
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	3-6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50-100
<i>Salmonella typhimurium</i>	3-6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50-100

*ND : activité non détectée jusqu'à une concentration de 100 μM .

5

2) Test de détection d'activité contre les champignons filamenteux et contre la levure *Candida albicans*.

10 - L'activité antifongique a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les spores des champignons à tester ont été mises en suspension dans un milieu de culture de type « Pomme de terre-Glucose ». De préférence, on utilise 12 g de milieu Potato Dextrose Broth (Difco) pour 1 l d'eau déminéralisée. Deux antibiotiques ont été rajoutés au milieu de culture : la tétracycline (concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$) et la céfotaxime (100 $\mu\text{g/ml}$). On dépose 10 μl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 μl de milieu de culture contenant les spores (à une concentration finale de 10^4 spores/ml). L'incubation a été réalisée en chambre humide à 30°C durant 48 heures. La croissance fongique a été observée au microscope photonique après 24 h et quantifiée après 48 heures par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

15

20

25

- Les différentes souches de levure ont été mises en incubation dans un milieu de culture de type « Sabouraud » et incubée à 30°C pendant 24 h sous agitation lente. L'échantillon à tester (10 µl) a été déposé dans des puits de plaque de microtitration dans lesquels ont été ajoutés 90 µl d'une culture diluée de levure dont la densité a été ajustée à DO 600 = 0,001. On évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

Les champignons filamenteux et levure qui ont été utilisés sont les suivants :

Aspergillus fumigatus (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) ; *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride* (mycothèque de l'Université Catholique de Leuven, Belgique) ; *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, (mycothèque de la Société Clause, Paris) ; *Candida albicans* (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg).

Le tableau 3 ci-dessous rapporte l'activité de la spinigérine contre les champignons.

Tableau 3

champignons	Spinigérine CMI (µM)
<i>Neurospora crassa</i>	3-6
<i>Fusarium culmorum</i>	1,5-3
<i>Nectria haematococca</i>	0,4-0,8
<i>Trichoderma viride</i>	1,5-3
<i>Candida albicans</i>	3-6

REVENDEICATIONS

1) Peptide de séquence (I):

5 $\beta_1 \phi_2 \theta_3 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20}$
 $\phi_{21} \phi_{22} \sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$

ou un fragment de celle-ci, dans laquelle :

- les acides aminés β_1 , β_4 , β_5 , β_9 , β_{14} , β_{17} , β_{20}
 et β_{24} sont indépendamment choisis parmi les acides aminés
 basiques,

10 - les acides aminés ϕ_2 , ϕ_6 , ϕ_{10} , ϕ_{11} , ϕ_{12} , ϕ_{13} ,
 ϕ_{16} , ϕ_{18} , ϕ_{19} , ϕ_{21} , ϕ_{22} et ϕ_{25} sont indépendamment choisis
 parmi les acides aminés hydrophobes,

15 - les acides aminés θ_3 , θ_8 et θ_{15} sont
 indépendamment choisis parmi les acides aminés
 chargés négativement ou de nature polaire/large,

- les acides aminés σ_7 et σ_{23} sont
 indépendamment choisis parmi la glycine, la sérine,
 l'alanine ou la thréonine,

20 - éventuellement l'un au moins des acides
 aminés β_1 , ϕ_2 , θ_3 , ϕ_{22} , σ_{23} , β_{24} , ou ϕ_{25} est absent.

25 2) Peptide selon la revendication 1,
 caractérisé en ce qu'il présente une configuration en
 hélice alpha.

30 3) Peptide selon l'une des revendications 1 ou
 2, caractérisé en ce qu'un groupe de 1 à 4 acides aminés à
 l'une et/ou l'autre des extrémités N et/ou C terminales
 est supprimé.

4) Peptide selon l'une quelconque des
 revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il répond à une
 des formules suivantes :

$\beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21} \phi_{22} \sigma_{23} \beta_{24} \phi_{25}$ (II)

$\beta_1 \phi_2 \theta_3 \beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21}$ (III)

$\beta_4 \beta_5 \phi_6 \sigma_7 \theta_8 \beta_9 \phi_{10} \phi_{11} \phi_{12} \phi_{13} \beta_{14} \theta_{15} \phi_{16} \beta_{17} \phi_{18} \phi_{19} \beta_{20} \phi_{21}$ (IV).

5) Peptide selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les acides aminés basiques sont choisis parmi l'arginine, La lysine ou l'histidine.

6) Peptide selon l'une quelconque des
10 revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les acides aminés hydrophobes sont choisis parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, ou le tryptophane.

7) Peptide selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les acides aminés chargés négativement ou de nature polaire/large sont choisis parmi l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine, ou la glutamine.

8) Peptide selon l'une quelconque des
20 revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est constitué par l'une des séquences suivantes :

25 H V D K K V A D K V L L L K Q L R I M R L L T R L (SEQ ID NO : 1)

K K V A D K V L L L K Q L R I M R L L T R L (SEQ ID NO : 2)

H V D K K V A D K V L L L K Q L R I M R L (SEQ ID NO : 3)

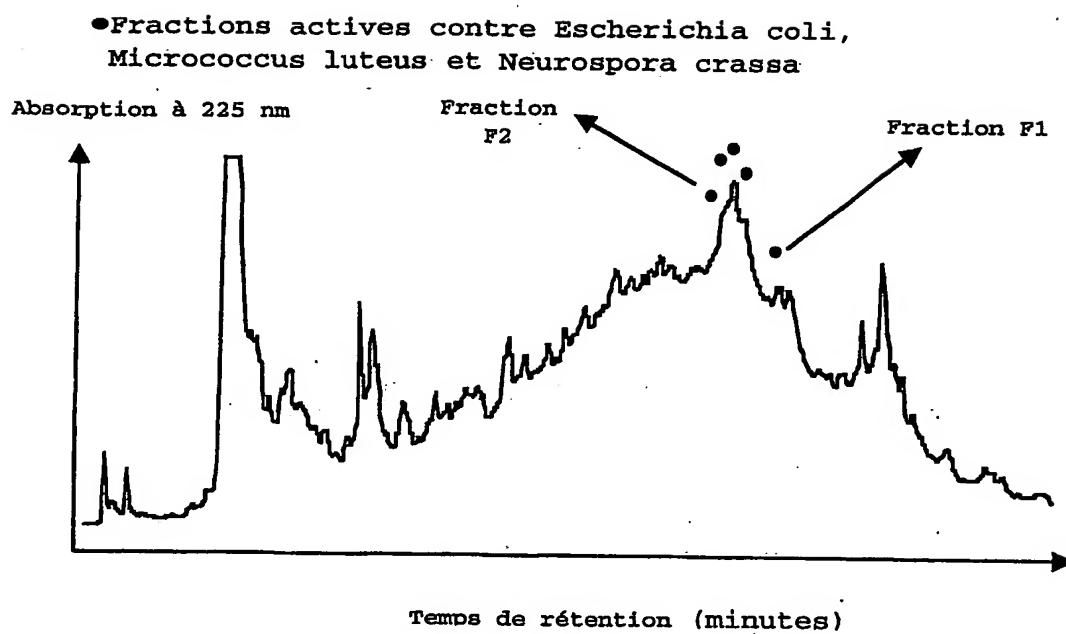
30 K K V A D K V L L L K Q L R I M R L (SEQ ID NO : 4)

9) Composition antibactérienne ou
antifongique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre
d'agent actif au moins un peptide selon l'une quelconque
des revendications 1 à 8, avantageusement associé dans
35 ladite composition avec un véhicule acceptable.

10) Utilisation d'un peptide selon l'une
quelconque des revendications 1 à 8 pour la préparation
d'une composition pour le traitement ou la prévention
d'une infection fongique ou bactérienne chez l'homme ou
l'animal.

11) Utilisation d'un peptide selon l'une
quelconque des revendications 1 à 8 pour la préparation
d'une composition pour le traitement ou la prévention
d'une infection fongique ou bactérienne chez les plantes.

Fig.1



LISTE DE SEQUENCES

<110> Centre National de la Recherche Scientifique
ENTOMED SA

<120> Peptides antibactériens et antifongiques, leur procédé
de préparation et les compositions les contenant

<130> 8599pct-29juin2001

<140> PCT/FR0x/xxxxx
<141> 2001-06-29

<150> FR00/08436
<151> 2000-06-29

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (25)

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 1
His Val Asp Lys Lys Val Ala Asp Lys Val Leu Leu Leu Lys Gln Leu
1 5 10 15
Arg Ile Met Arg Leu Leu Thr Arg Leu
20 25

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (22)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 2

Lys Lys Val Ala Asp Lys Val Leu Leu Leu Lys Gln Leu Arg Ile Met
1 5 10 15

Arg Leu Leu Thr Arg Leu
20

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (21)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 3

His Val Asp Lys Lys Val Ala Asp Lys Val Leu Leu Leu Lys Gln Leu
1 5 10 15

Arg Ile Met Arg Leu
20

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) .. (18)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

WO 02/00836

PCT/FR01/02100

3

<400> 4

Lys Lys Val Ala Asp Lys Val Leu Leu Leu Lys Gln Leu Arg Ile Met
1 5 10 15

Arg Leu